意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮的适宜赖氨酸水平[1]

王　帅　王红芳　胥保华*

（山东农业大学动物科技学院，泰安 271018）

摘　要：本试验旨在研究意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮的适宜赖氨酸水平，为探明意大利蜜蜂工蜂幼虫发育阶段的赖氨酸营养需要提供理论依据。选用 1 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫 1 200 只，随机分为 5 个组，每个组 5 个重复，每个重复 48 只。5 组工蜂幼虫分别饲喂赖氨酸实测水平分别为 6.08（对照）、11.08、16.08、21.08 和 26.08 mg/g 的饲粮，饲养至幼蜂羽化出房。分别于特定日龄测定工蜂幼虫化蛹率（6 日龄）、虫体总蛋白含量（6 日龄）、羽化率（21 日龄）等生长指标以及血淋巴生化指标和免疫相关指标（6 日龄）。结果表明：1）11.08 mg/g 赖氨酸组的工蜂幼虫化蛹率和羽化率极显著高于其他各组（P<0.01）。2）与对照组相比，11.08~26.08 mg/g 赖氨酸组 6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量和血淋巴中游离赖氨酸含量显著提高（P<0.05），其中饲粮赖氨酸水平为 26.08 mg/g 时 6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量和血淋巴中游离赖氨酸含量最高。3）6 日龄工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量随饲粮赖氨酸水平的升高呈先下降后上升的趋势，其中饲粮赖氨酸水平为 16.08 mg/g 时处于最低值，极显著低于其他各组（P＜0.01）。4）11.08~21.08 mg/g 赖氨酸组 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性显著高于对照组（P<0.05），但随着饲粮赖氨酸水平由 21.08 mg/g 升高到 26.08 mg/g，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性急剧下降，26.08 mg/g 赖氨酸组显著低于其他各组（P<0.05）。5）饲粮赖氨酸水平为 11.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫虫体溶菌酶基因的相对表达量最高，显著高于其他赖氨酸水平时（P<0.05)。与对照组相比，11.08~16.08 mg/g 赖氨酸组 6 日龄工蜂幼虫虫体防卫素 1 基因的相对表达量显著增加（P<0.05)。由此得出，赖氨酸能够促进意大利蜜蜂工蜂幼虫生长，促进蛋白质和赖氨酸的沉积，提高羽化率，并在一定程度上对脂质代谢和幼虫免疫能力产生调节作用；综合考虑上述指标，推荐意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮的适宜赖氨酸水平为 11.08~16.08 mg/g。

关键词：意大利蜜蜂；工蜂；幼虫；赖氨酸

中图分类号：S816　　文献标识码：A　　文章编号：

收稿日期：2017-04-11

基金项目：本研究由国家蜂产业技术体系建设专项资金(CARS-45)，山东省农业良种工程项目“优质高产蜜蜂及蚕桑新品种培育（2014-2016）”资助。

作者信息：王　帅（1993-），男，山东潍坊人，硕士研究生，研究方向为蜜蜂营养与饲料。E-mail： 619130691@qq.com

*通信作者：胥保华，教授，博士生导师，E-mail： bhxu@sdau.edu.cn

赖氨酸是蜜蜂体内的一种必需氨基酸[1]，对蜜蜂的生长发育有至关重要的作用，在促进动物生长发育、脂肪代谢、提高免疫力等方面起到重要作用[2-6]。研究意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮适宜赖氨酸水平对于科学、健康饲养意大利蜜蜂具有重要意义。赖氨酸是动物生长发育的必需氨基酸之一[1]，其在动物体内不能完全合成，必须从饲粮中获取，故称为必需氨基酸。赖氨酸分为 *L*-型和 *D*-型 2 种同分异构体。*D*-型赖氨酸几乎不能被吸收利用，具有生物活性的主要是 *L*-型赖氨酸。诸多试验证明，饲粮中添加适量的赖氨酸可以提高或改善家禽的体重、采食量、体增重、饲料转化率以及胴体品质[7-8]。研究发现适宜的饲粮赖氨酸水平能显著降低肉仔鸡血清尿酸、甘油三脂、极低密度脂蛋白等的含量[2-3]。Kornegay 等[4]研究了饲粮中赖氨酸水平与断奶仔猪免疫功能的关系，结果表明，随着赖氨酸水平的提高，仔猪卵清蛋白免疫后抗体水平提高。Konashi 等[5]研究发现，饲粮缺乏赖氨酸使蛋白质的合成受到抑制，同时限制了淋巴细胞的增殖，从而使肉仔鸡的免疫力降低，进而提高了发病率和死亡率。Chen 等[6]发现赖氨酸能提高肉仔鸡新城病毒抗体水平，但赖氨酸不足时会使肉仔鸡抗体应答和细胞免疫降低。适宜的饲粮蛋白质类型能够显著影响小肠的形态结构，提高小肠绒毛长度和隐窝深度[9]。De Groot[1]推测蜜蜂成蜂赖氨酸需要量在 0.6%左右。意大利蜜蜂赖氨酸的需要量目前仍无推荐标准，对赖氨酸的营养功能和需要量的研究是蜜蜂蛋白质营养需要研究的重要组成部分，也是科学配制蜜蜂幼虫饲粮的基础。因此，本试验通过研究饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫生长指标、血淋巴生化指标及免疫相关指标的影响，确定意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮的适宜赖氨酸水平，为意大利蜜蜂的科学饲养提供一定依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验动物为意大利蜜蜂工蜂幼虫，取自蜂群健康、群势基本相同的蜂群。试验用赖氨酸为上海阿拉丁生化科技股份有限公司产品，货号为 L103479-25g，纯度为 98%。

1.2 意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮配制

试验采用 5 种不同赖氨酸水平的人工幼虫饲粮饲喂意大利蜜蜂工蜂幼虫，5 种饲粮分别标记为 A、B、C、D、E，A 为不额外添加赖氨酸的基础饲粮（对照），赖氨酸的实测水平为 6.08 mg/g。B、C、D、E 分别为在基础饲粮中分别添加 0.5%、1.0%、1.5%和 2.0%赖氨酸的试验饲粮，赖氨酸的实测水平分别为 11.08、16.08、21.08、26.08 mg/g。5 种意大利工

蜂幼虫饲粮组成及营养水平见表 1。

表 1　5 种意大利工蜂幼虫饲粮组成及营养水平（饲喂基础）

Table 1　Composition and nutrient levels of five diets for Italy worker bee larvae　（as-fed basis）　%

项目 Items	饲粮 Diets				
	A	B	C	D	E
原料 Ingredients					
蜂王浆 Royal jelly	50.00	50.00	50.00	50.00	50.00
葡萄糖 Glucose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
果糖 Fructose	6.00	6.00	6.00	6.00	6.00
酵母提取物 Yeast extract	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
赖氨酸 Lysine		0.50	1.00	1.50	2.00
无菌水 Sterile water	37.00	36.50	36.00	35.50	35.00
合计 Total	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
营养水平 Nutrient levels					
总能 GE/(MJ/kg)	6.36	6.38	6.37	6.38	6.40
赖氨酸 Lysine/(mg/g)	6.08	11. 08	16.08	21.08	26.08

总能和赖氨酸均为实测值。GE and lysine were measured values.

1.3　试验分组与饲养管理

试验于 2016 年在山东农业大学动物科技学院完成，供试蜂场为山东农业大学南校区试验蜂场。选用 1 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫 1 200 只，随机分为 5 组，每组 5 个重复，每个重复 48 只幼虫。5 组工蜂幼虫分别饲喂赖氨酸实测水平分别为 6.08、11.08、16.08、21.08 和 26.08 mg/g 的饲粮。将 1 日龄工蜂幼虫放入 48 孔板中，每孔添加 150 μL 饲粮，将培养板放入干燥器（相对湿度为 95%，15%甘油溶液），干燥器放入培养箱（35 ℃、相对湿度为 90%）中饲养，每天换 1 次料。培养至 6 日龄时，将大幼虫转移至铺满无菌垫纸的 24 孔板上化蛹（停止饲喂），9 日龄时将蜂蛹转移至新的铺满无菌垫纸的 24 孔板中，饲养至幼蜂羽化出房。分别于特定日龄测定工蜂幼虫化蛹率、体蛋白质含量、羽化率等生长指标以及血淋巴生化指标和免疫相关指标。

1.4　测定指标及方法

1.4.1　样本处理方法

每组随机选取 3 只 6 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫作为分子生物学样品，用于研究蜜蜂化蛹

前相关基因的相对表达量。每组随机选取 3 只 6 日龄工蜂幼虫进行组织匀浆，用生理盐水配制成 1%的匀浆液，一部分于 4 ℃条件下 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清，另一部分用于测定工蜂幼虫虫体蛋白质含量；每组随机选取 100 只 6 日龄幼虫，采用直径 20 μL 的毛细采血管汲取工蜂幼虫血淋巴，用于测定血淋巴中游离赖氨酸、甘油三酯含量和溶菌酶活性。

1.4.2 工蜂幼虫化蛹率、羽化率的计算

以重复为单位，于 6 日龄统计化蛹幼虫数，于 21 日龄统计幼虫羽化出房总数，分别计算化蛹率和羽化率。

化蛹率（%）=100×化蛹幼虫数/幼虫总数；

羽化率（%）=100×幼虫羽化出房总数/化蛹幼虫数。

1.4.3 工蜂幼虫虫体总蛋白含量的测定

采用南京建成生物工程研究所生产的货号为 A045-2 的总蛋白定量测试盒测定 6 日龄幼虫 1%组织匀浆液中总蛋白含量，每组 3 个重复。

1.4.4 工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量的测定

采用泉州市科诺迪生物科技有限公司生产的货号为 SU-B97004 的昆虫赖氨酸试剂盒测定 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量，每组 3 个重复。

1.4.5 工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量的测定

采用泉州市科诺迪生物科技有限公司生产的货号为 SU-B97002 的昆虫甘油三酯试剂盒测定 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯的含量，每组 3 个重复。

1.4.6 工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性的测定

采用泉州市科诺迪生物科技有限公司生产的货号为 SU-B97001 的昆虫溶菌酶试剂盒测定 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性，每组 3 个重复。

1.4.7 工蜂幼虫虫体溶菌酶、防卫素 1 基因相对表达量的测定

采用 Trizol 法提取样品总 RNA，使用反转录试剂盒（TaKaRa）将提取的总 RNA 样品立即反转录为 cDNA，调节样品 cDNA 浓度于相同水平后，-20 ℃保存备用。取 1 μL cDNA（5 倍稀释）加入到 20 μL 荧光定量 PCR 体系中，按照荧光定量 PCR 试剂盒（TaKaRa）操作指南，用 PCR 仪检测目的基因的相对表达量。目的基因引物设计参考序列来自于 NCBI 数据库，以 β-actin 为内参基因，采用 Primer 5.0 进行引物设计，委托上海生工生物科技有限

公司合成引物，引物序列见表 2。

表 2　基因引物序列

Table 2　Primer sequences of genes

目的基因 Target genes	引物序列 Primer sequence (5′-3′)	GenBank 登录号 GenBank accession number
溶菌酶 Lysozyme	F:TGGTAATGGCAACAGAAATGG	NC__007075
	R:TATACGAAATGGTCCGCAAAC	
防卫素 1 Defensin 1	F:CGTGCCGACAGACATAGAAG	NC__007082
	R:TCCTTTCTCGCAATGACCTC	

1.5　数据分析

采用 SAS 9.2 软件对数据进行单因素方差分析（one-way ANOVA）和 Duncan 氏法多重比较，*P*＜0.01 表示差异极显著，*P*<0.05 表示差异显著。结果以柱形图或折线图表示。

2　结　果

2.1　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫化蛹率的影响

由图 1 可知，6 日龄工蜂幼虫化蛹率随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势。饲粮赖氨酸水平为 11.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫化蛹率达到峰值，且 11.08 mg/g 赖氨酸组极显著高于其他各组（*P*＜0.01）。当饲粮赖氨酸水平由 11.08 mg/g 逐渐升高到 26.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫化蛹率呈梯度下降的趋势，且 16.08、21.08 和 26.08 mg/g 赖氨酸组之间差异极显著（*P*＜0.01），其中 21.08 和 26.08 mg/g 赖氨酸组极显著低于对照组和 11.08 mg/g 赖氨酸组（*P*＜0.01）。

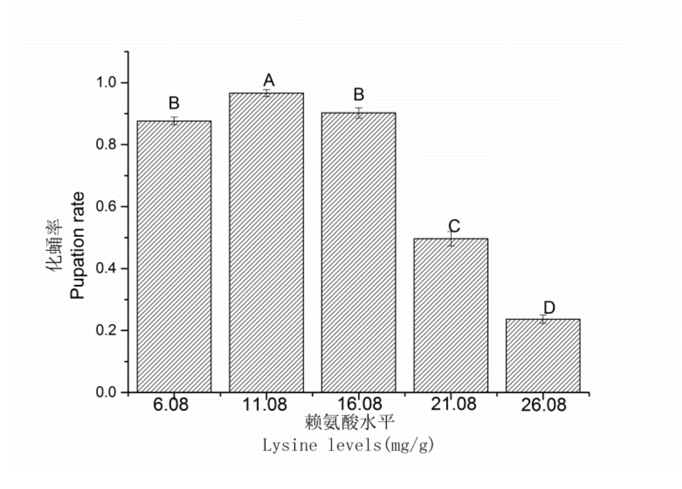
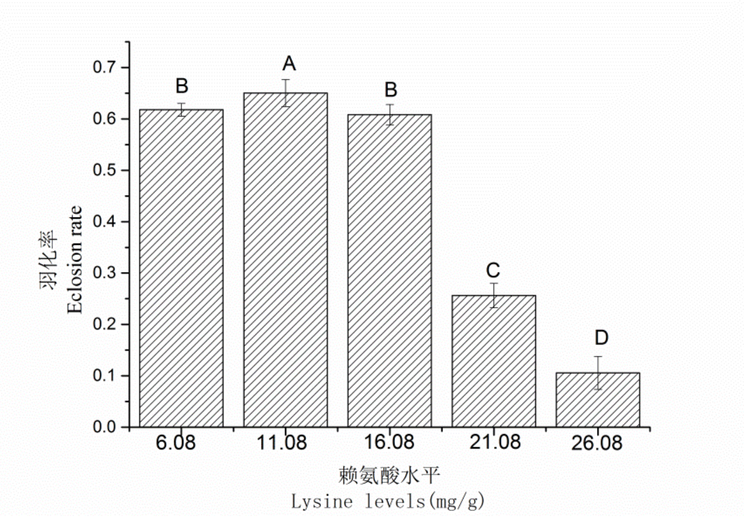


图 1 饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫化蛹率的影响

Fig.1 Effects of dietary lysine level of pupation rate of 6-day-old worker bee larvae

2.2 饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫羽化率的影响

由图 2 可知，21 日龄工蜂幼虫羽化率随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势。饲粮赖氨酸水平为 11.08 mg/g 时，21 日龄工蜂幼虫羽化率达到峰值，且 11.08 mg/g 赖氨酸组极显著高于其他各组（P<0.01）。当饲粮赖氨酸水平由 11.08 mg/g 逐渐升高到 26.08 mg/g 时，21 日龄工蜂幼虫羽化率呈梯度下降的趋势，且 16.08、21.08 和 26.08 mg/g 赖氨酸组之间差异极显著（P<0.01），其中 21.08 和 26.08 mg/g 赖氨酸组极显著低于对照组和 11.08 mg/g 赖氨酸组（P<0.01）。



数据柱或数据点标注不同大写字母表示差异极显著（P<0.01），不同小写字母表示差异显著（P<0.05）。下图同。

Date columns or date points with different capital letters mean extremely significant difference （P<0.01）, and with different small letters mean significant difference （P<0.05）. The same as below.

图 2 饲粮赖氨酸水平对 21 日龄工蜂幼虫羽化率的影响

Fig.2 Effects of dietary lysine level on eclosion rate of 21-day-old worker bee larvae

2.3 饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体总蛋白含量的影响

由图 3 可知，随着饲粮赖氨酸水平的升高，6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量总体呈上升趋势。与饲料赖氨酸水平为 6.08 mg/g 时相比，饲粮赖氨酸水平为 11.08~26.08 mg/g 时 6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量显著升高（P<0.05），其中赖氨酸水平为 26.08 mg/g 时 6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量最高，显著高于其他各组（P<0.05）。

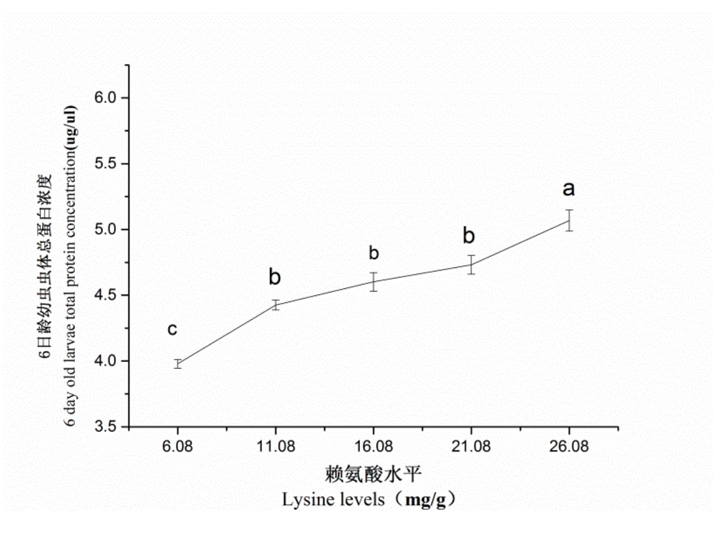


图 3　饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫虫体总蛋白含量的影响

Fig.3　Effects of dietary lysine level on total protein content in whole body of 6-day-old worker bee larvae

2.4　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量的影响

由图 4 可知，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量随着饲粮赖氨酸水平的升高整体呈上升趋势。饲粮赖氨酸水平由 6.08 mg/g 升高到 11.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量显著增加（P＜0.05）；饲粮赖氨酸水平为 11.08~26.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量随饲粮赖氨酸水平的升高有所增加，各组间差异虽未达到显著水平（P>0.05），但均显著高于对照组（P＜0.05）。

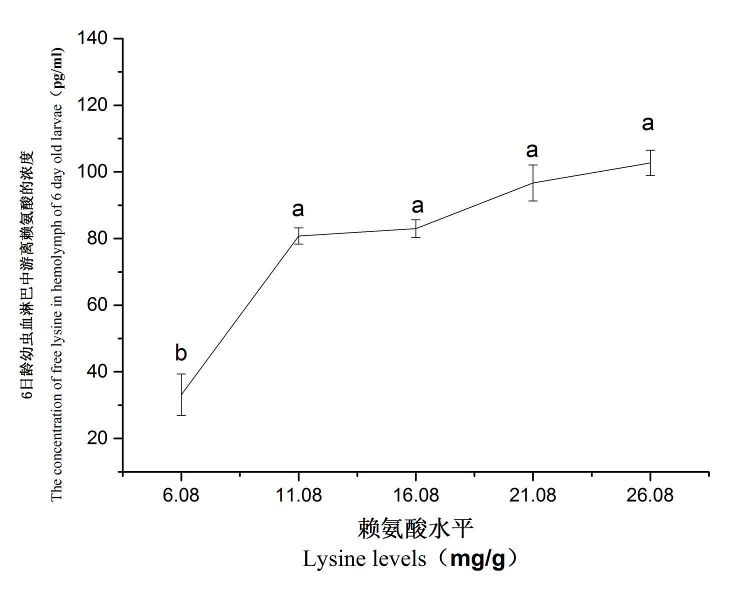


图 4　饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量的影响

Fig.4　Effects of dietary lysine level on free lysine content in hemolymph of 6-day-old worker bee larvae

2.5　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量的影响

由图 5 可知，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量随着饲粮赖氨酸水平的升高整体呈先下降后上升趋势。饲粮赖氨酸水平为 16.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量达到最低值，极显著低于其他各组（$P<0.01$）。

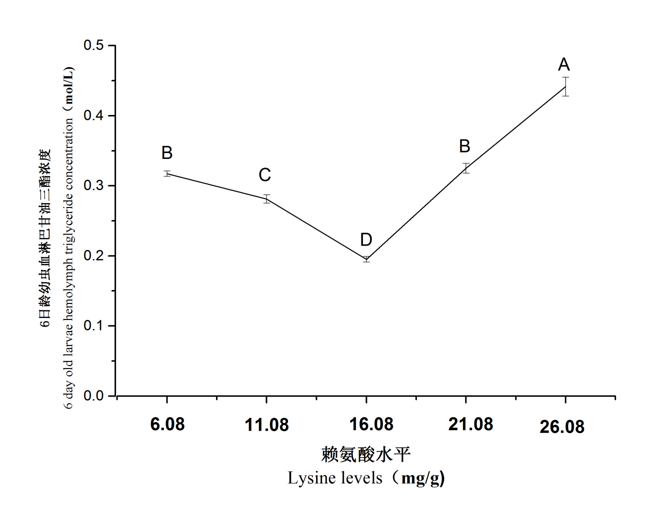


图 5　饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量的影响

Fig.5　Effects of dietary lysine level on triglyceride content in haemolymph of 6-day-old worker bee larvae

2.6　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性的影响

由图 6 可知，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性随着饲粮赖氨酸水平的升高整体呈抛物线形。饲粮赖氨酸水平由 6.08 mg/g 升高到 11.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性表现为显著上升（$P<0.05$）；饲粮赖氨酸水平为 11.08~21.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性随饲粮赖氨酸水平的升高无显著变化（$P>0.05$），但显著高于饲粮赖氨酸水平为 6.08 mg/g 时（$P<0.05$）；饲粮赖氨酸水平为 26.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性急剧下降至最低值，显著低于其他各组（$P<0.05$）。

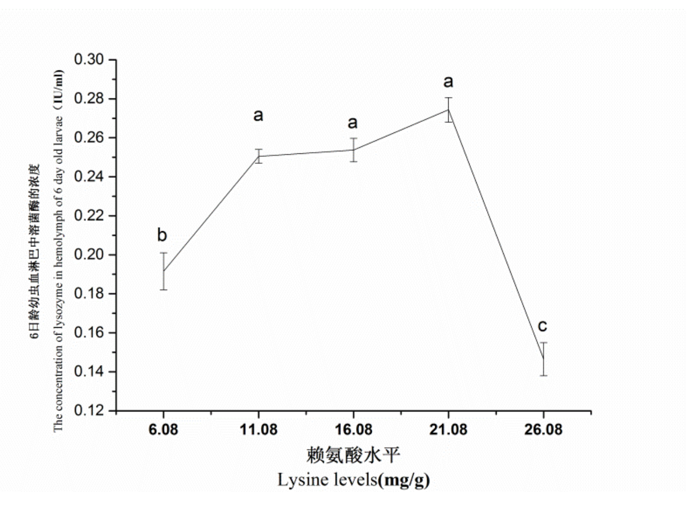


图 6 饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性的影响

Fig.6 Effects of dietary lysine level on lysozyme activity in haemolymph of 6-day-old worker bee larvae

2.7 饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体溶菌酶基因相对表达量的影响

由图 7 可知，6 日龄工蜂幼虫虫体溶菌酶基因的相对表达量随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势。饲粮赖氨酸水平为 11.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫虫体溶菌酶基因的相对表达量达到峰值，且显著高于其他各组（P<0.05）；当饲粮赖氨酸水平由 11.08 mg/g 逐渐升高到 26.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫虫体溶菌酶基因的相对表达量呈梯度下降的趋势，其中 16.08 mg/g 赖氨酸组显著高于对照组（P<0.05），21.08、26.08 mg/g 赖氨酸组与对照组差异不显著（P>0.05）。

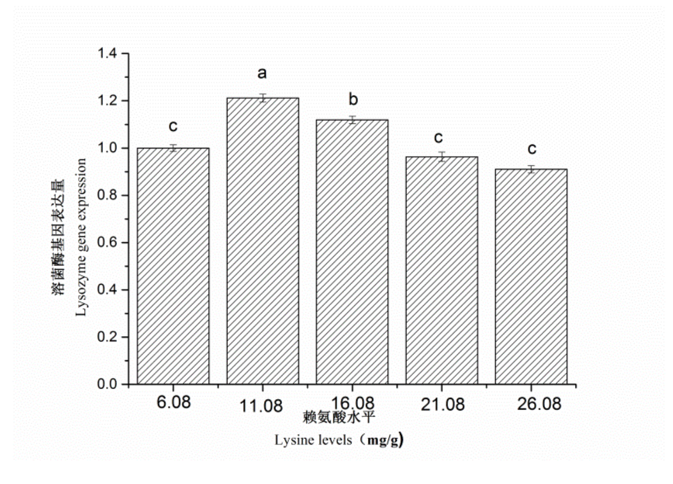


图 7 饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫虫体溶菌酶基因相对表达量的影响

Fig.7 Effects of dietary lysine level on the relative expression level of lysozyme gene in whole body of 6-day-old worker bee larvae

2.8　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体防卫素 1 基因相对表达量的影响

由图 8 可知，6 日龄工蜂幼虫虫体防卫素 1 基因的相对表达量随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势。饲粮赖氨酸水平为 11.08～16.08 mg/g 时 6 日龄工蜂幼虫虫体防卫素 1 基因的相对表达量达到较高水平，且显著高于对照组（P＜0.05）；当饲粮赖氨酸水平继续升高至 21.08、26.08 mg/g 时，6 日龄工蜂幼虫虫体防卫素 1 基因的相对表达量呈下降趋势，与 11.08、16.08 mg/g 赖氨酸组差异显著（P＜0.05），但与对照组差异不显著（P>0.05）。

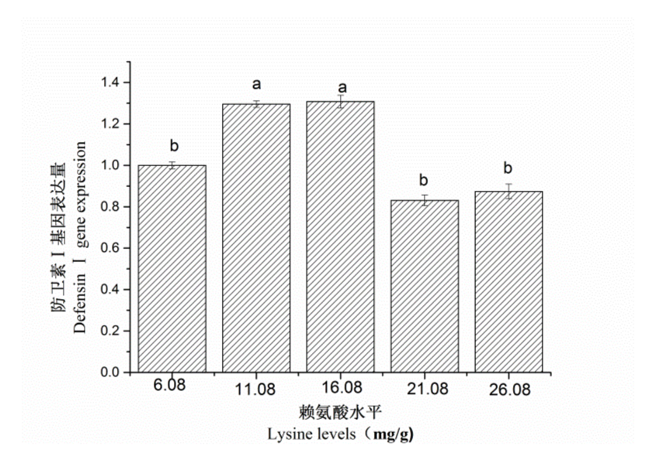


图 8　饲粮赖氨酸水平对 6 日龄工蜂幼虫防卫素 1 基因相对表达量的影响

Fig.8　Effects of dietary lysine level on the relative expression level of defensin 1 gene in whole body of 6-day-old worker bee larvae

3　讨　论

3.1　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫化蛹率、羽化率的影响

意大利蜜蜂的化蛹率和羽化率，是直接反映意大利蜜蜂幼虫生长发育状况的重要指标。通过研究必需氨基酸缺乏或者蛋白质缺乏对昆虫生长、生殖等的影响，发现意大利蜜蜂营养缺乏会缩短其寿命、降低其产卵力、抑制其腺体发育、使其体重下降及抗病力下降等[10-11]。营养因素是影响意大利蜜蜂级型分化的一个重要因素，并且能够影响意大利蜜蜂幼虫的发育过程，如在空间因素一定的情况下，营养水平能够决定幼虫发育成蜂王还是工蜂[12]。由此推断，影响蜜蜂化蛹和羽化的因素可能很多，其中营养因素的作用不容忽视，营养不良的意大利蜜蜂幼虫可能不能正常化蛹和羽化，相反，营养充足的意大利蜜蜂幼虫可能更容易正常羽化和发育。本研究结果显示，饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫的化蛹率和羽化率均有极显著影响，饲粮赖氨酸水平过低或过高均可能会导致意大利蜜蜂工蜂幼虫不能正常化蛹

和羽化，饲粮赖氨酸水平为 11.08 mg/g 时最有利于意大利蜜蜂工蜂幼虫正常的化蛹和羽化。

3.2 饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体总蛋白含量的影响

赖氨酸主要用于蛋白质沉积，还参与酶蛋白和某些多肽激素的合成，因此与生长密切相关。赖氨酸作为机体必需氨基酸，参与体内骨骼肌、酶、血清蛋白、多肽激素等多种蛋白质的合成。早期的动物试验已证实，长期进食低赖氨酸饲粮会抑制大鼠的生长，降低大鼠血清白蛋白和 β-球蛋白含量，肝脏蛋白质的合成也受到抑制[13]。已有研究表明赖氨酸可以通过自噬体-溶酶体系统抑制部分肌纤维蛋白质降解，维持机体蛋白质的稳定[14]。Haunerland 等[15]研究发现，昆虫贮藏蛋白在昆虫变态发育时期具有重要作用，主要是作为氨基酸贮存库，为昆虫发育构成组织架构。因此，昆虫贮藏蛋白的多少是衡量昆虫能否发育完全的一个重要指标。由此也可以推测，昆虫虫体总蛋白越丰富，昆虫发育的可能越健全。本试验发现饲粮赖氨酸水平对 6 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体总蛋白含量存在显著影响，虫体总蛋白含量随着饲粮赖氨酸水平的升高总体呈上升趋势。饲粮赖氨酸水平为 6.08~11.08 mg/g 时处于上升范围；饲粮赖氨酸水平为 11.08~21.08 mg/g 时，虫体总蛋白含量随饲粮赖氨酸水平的升高无显著变化，但显著高于对照组；饲粮赖氨酸水平为 26.08 mg/g 时，虫体总蛋白含量达到峰值，显著高于其他各组。综上可知，饲粮赖氨酸水平为 26.08 mg/g 时意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体总蛋白含量最高。

3.3 饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量的影响

赖氨酸作为机体必需氨基酸，参与体内骨骼肌、酶、血清蛋白、多肽激素等多种蛋白质的合成[13]。赖氨酸是产生肉碱的前体物质，而肉碱负责将一些不饱和脂肪酸转化为能量，参与脂肪代谢，有利于降低胆固醇水平。蜜蜂的免疫机制需要赖氨酸的参与，赖氨酸对蜜蜂的免疫系统有至关重要的作用[16]。Ma 等[17]研究表明，饲粮赖氨酸水平对山羊血清中赖氨酸含量具有显著影响。由此推断，赖氨酸类营养物质在一定水平范围内可能会随营养水平的增加在体液中的含量逐渐增加，但是超过机体所需的最适水平后吸收效率及利用率可能会降低。本研究中发现饲粮赖氨酸水平对 6 日龄意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸含量的影响差异显著，饲粮赖氨酸水平为 6.08~11.08 mg/g 时，血淋巴中游离赖氨酸含量会随饲粮赖氨酸水平的升高呈升高趋势，但当饲粮赖氨酸水平增加至 11.08~26.08 mg/g 时，血淋巴中游离赖氨酸含量持续保持在较高水平，不再出现显著上升，但均显著高于对照组。综上认为，

饲粮赖氨酸水平为 11.08~26.08 mg/g 时，意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中游离赖氨酸的含量可保持在较高水平。

3.4　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量的影响

斯日古楞[4]研究了饲粮赖氨酸水平对 0~3 周龄肉仔鸡生长性能的影响，发现适宜赖氨酸水平对 0~3 周龄雄性肉仔鸡血清中甘油三酯的含量显著影响，随着饲粮赖氨酸水平的升高，血清中甘油三酯的含量先降低再升高。陈志敏等[5]研究发现饲料中适宜的赖氨酸水平能降低 0~3 周龄雄性肉仔鸡血清中尿酸、甘油三酯、低密度脂蛋白的含量。本研究中发现饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量存在极显著影响，血淋巴中甘油三酯含量随饲粮赖氨酸水平的升高整体呈先下降后上升趋势。饲粮赖氨酸水平为 16.08 mg/g 时，血淋巴中甘油三酯含量达到最低值，极显著低于对照组；当饲粮赖氨酸水平继续升高至 16.08~26.08 mg/g 时，血淋巴中甘油三酯含量呈梯度上升趋势，且这 3 组之间差异极显著；饲料赖氨酸水平为 11.08、16.08、26.08 mg/g 时与对照组相比差异极显著。这可能是因为饲粮中适宜水平的赖氨酸能够提高意大利蜜蜂工蜂幼虫的脂肪代谢，使得工蜂幼虫对脂肪的利用率提高，从而减少了血淋巴中甘油三酯的含量。综上认为，饲粮赖氨酸水平为 16.08 mg/g 时意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中甘油三酯含量最低。

3.5　饲粮赖氨酸水平对意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性以及虫体溶菌酶和防卫素 1 基因相对表达量的影响

Kornegay 等[4]研究了饲粮赖氨酸水平与断奶仔猪免疫功能的关系，结果表明，随着赖氨酸水平的升高，仔猪卵清蛋白免疫后抗体水平提高。Konashi 等[5]研究发现，饲粮缺乏赖氨酸使蛋白质的合成受到抑制，同时限制了淋巴细胞的增殖，从而使肉仔鸡免疫力降低，进而提高了发病率和死亡率。Chen 等[6]也发现，赖氨酸能提高肉仔鸡的新城病毒抗体水平，但赖氨酸缺乏时会使肉仔鸡抗体应答和细胞免疫降低。蜜蜂的免疫机制有细胞免疫和体液免疫 2 种，细胞免疫主要依靠增加血细胞的吞噬、成瘤和包囊作用，体液免疫主要是通过提高血浆中某些物质的含量来发挥免疫能力。体液免疫包括先天性免疫因子和后天性免疫因子。先天性免疫因子包括溶菌酶、凝集素、抑血细胞聚集素和酚氧化酶，后天性免疫因子包括防卫素、富脯氨酸抗菌肽和抗真菌肽。其中所有昆虫防卫素的序列中在 α-螺旋和 β-片层第 1 链之间都含有强阳离子氨基酸（精氨酸和赖氨酸）。在大部分防卫素的转角区与 C-末端也有

阳离子氨基酸存在，推测序列内这些带电荷的区域对防卫素的作用方式具有意义[16]。因此，蜜蜂的免疫机制需要赖氨酸的参与，赖氨酸对蜜蜂的免疫系统有至关重要的作用。本试验发现，饲粮赖氨酸水平为6.08~11.08 mg/g时，意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性随饲粮赖氨酸水平的升高呈上升趋势；饲粮赖氨酸水平为11.08~21.08 mg/g时，意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性随饲粮赖氨酸水平的升高无显著变化，但显著高于对照组；饲粮赖氨酸水平为21.08~26.08 mg/g时，意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性随饲粮赖氨酸水平的升高呈下降趋势。此外，本试验还发现，意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体溶菌酶基因的相对表达量随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势，在赖氨酸水平为11.08 mg/g时溶菌酶基因的相对表达量达到峰值；意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体防卫素1基因的相对表达量随饲粮赖氨酸水平的升高呈先上升后下降的趋势，在赖氨酸水平为11.08~16.08 mg/g时其相对表达量达到较高水平。综上认为，饲粮赖氨酸水平为11.08~16.08 mg/g时，赖氨酸能最大限度地提升意大利蜜蜂工蜂幼虫的免疫力。

4 结　论

① 饲粮赖氨酸水平为11.08 mg/g时能显著提高意大利蜜蜂工蜂幼虫的化蛹率、羽化率以及虫体溶菌酶和防卫素1基因的表达。

② 饲粮赖氨酸水平为16.08 ~21.08 mg/g时意大利蜜蜂工蜂幼虫血淋巴中溶菌酶活性以及防卫素1基因的表达均有不同程度的提高，但当饲粮赖氨酸水平超过16.08 mg/g后，化蛹率、羽化率以及免疫相关基因的表达又会受到抑制。

③ 意大利蜜蜂工蜂幼虫虫体总蛋白含量和血淋巴中游离赖氨酸含量随饲粮赖氨酸水平的升高呈逐渐上升的趋势，饲粮赖氨酸水平为26.08 mg/g时，虫体总蛋白含量和血淋巴中游离赖氨酸含量均处于最高值。

④ 综合考虑以上指标，推荐意大利蜜蜂工蜂幼虫饲粮的适宜赖氨酸水平为11.08~16.08 mg/g。

参考文献:

[1] DE GROOT A P.Protein and amino acid requirement of the honeybee (*Apis mellifera* L.)[J].Physiologia Comparata et Oecologia,1953,3:197–285.

[2] 斯日古楞.日粮不同赖氨酸水平对0~3周龄肉仔鸡生产性能和胴体品质的影响[D].硕士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2004.

[3] 陈志敏,蔡辉益,于会民,等.不同赖氨酸添加水平对肉仔鸡血液生理生化指标的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2006(11):68–69.

[4] KORNEGAY E T,LINDEMAN M D,RAVINDRAN V.Effects of dietary lysine levels on performance and Immune response of weanling pigs housed at two floor space allowances[J].Journal of Animal Science,1993,71(3):552–556.

[5] KONASHI S,TAKAHASHI K,AKIBA Y.Effect of dietary essential amino acid deficiency on immunological variables in broiler chickens[J].British Journal of Nutrition, 2000,83(4):449–456.

[6] CHEN C,SANDER J,DALE N M.The effect of dietary lysine deficiency on the immune response to Newcastle disease vaccination in chickens[J].Avian Diseases,2003,47(4):1346–1351.

[7] 刘苑青.肉鸭日粮中可消化蛋氨酸和赖氨酸需要量的研究[D].硕士学位论文.武汉:华中农业大学,2009.

[8] BONS A,TIMMLER R,JEROCH H.Lysine requirement of growing male Pekin ducks[J].British Poultry Science,2002,43(5):677–686.

[9] 陈代文,杨凤,陈可容,等.仔猪补饲及不同类型的饲粮蛋白质对仔猪小肠黏膜形态结构的影响[J].动物营养学报,1996,8(2):18–24.

[10] AVNI D,HENDRIKSMA H P,DAG A,et al.Nutritional aspects of honey bee-collected pollen and constraints on colony development in the eastern Mediterranean[J].Journal of Insect Physiology,2014,69:65–73.

[11] ALAUX C,DUCLOZ F,CRAUSER D,et al.Diet effects on honeybee immune competence[J].Biology Letters,2010,6(4):562–565.

[12] 石元元.营养和空间因素对雌性蜜蜂发育的影响[D].硕士学位论文.南昌:江西农业大学,2011:1–20.

[13] CANFIELD L,CHYTIL F.Effect of low lysine diet on rat protein metabolism[J].Journal of Nutrition,1978,108(8):1343–1347.

[14] SATO T,ITO Y,NAGASAWA T.Regulation of skeletal muscle protein degradation and synthesis by oral administration of lysine in rats[J].Journal of Nutrition Science and Vitaminogy,2013,59(5):412–419.

[15] HAUNERLAND N H.Insect storage proteins:gene families and receptors[J].Insect Biochemistry and Molecular Biology,1996,26(8/9):755–765.

[16]王荫长.昆虫生理学[M].北京:中国农业出版社,2004.

[17] MA H,ZHANG W,SONG W H,et al.Effects of tryptophan supplementation on cashmere fiber characteristics,serum tryptophan,and related hormone concentrations in cashmere goats[J].Domestic Animal Endocrinology,2012,43(3):239–250.

Dietary Appropriate Lysine Level for *Apis mellifera ligustica* Worker Bee Larvae

WANG Shuai WANG Hongfang XU Baohua*

（*College of Animal Science and Technology*, *Shandong Agricultural University*, *Tai'an* 271018, *China*）

Abstract: The objective of this experiment was to research the appropriate level of lysine in the

*Corresponding author, professor, E-mail： bhxu@sdau.edu.cn （责任编辑 菅景颖）

diet for *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae, and to provide the theoretical basis for the study of lysine requirement of *Apis mellifera ligustica* worker bee in larvae stage. A total of 1 200 one-day-old *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae were randomly divided into 5 groups with 5 replicates per group and 48 larvae per replicate. The worker bee larvae in 5 groups were fed diets with the measured level of lysine was 6.08 （control）, 11.08, 16.08, 21.08 and 26.08 mg/g until emergence, respectively. The growth indexes, such as pupation rate (6-day-old), total protein content in whole body (6-day-old), eclosion rate (21-day-old), and the hemolymph biochemical parameters and immune related indicators (6-day-old) of worker bee larvae were measured to certain age, respectively. The results showed as follows: 1) the pupation rate and eclosion rate of worker bee larvae in 11.08 mg/g lysine group were extremely significantly higher than those in other groups (P<0.01). 2） Compared with the control group, the total protein content in whole body and the free lysine content in hemolymph of 6-day-old worker bee larvae in 11.08 to 26.08 mg/g lysine groups were significantly increased (P<0.05), and the highest values of them were found in 26.08 mg/g lysine group. 3) The hemolymph triglyceride content of 6-day-old worker bee larvae was decreased firstly and then increased with dietary lysine level increasing, and the lowest value was found in 16.08 mg/g lysine group which was extremely significantly lower than that in other groups (P<0.01). 4) The haemolymph lysozyme activity of 6-day-old worker bee larvae was significantly higher than that of control group (P<0.05), but with dietary lysine level was increased from 21.08 to 26.08 mg/g, the haemolymph lysozyme activity decreased rapidly, and it in 26.08 mg/g lysine group was significantly lower than that in other groups (P<0.01). 5) When dietary lysine level was 11.08 mg/g, the relative expression level of lysozyme gene of 6-day-old worker bee larvae was the highest, which was significantly higher than that of the other lysine levels (P<0.05). Compared with the control group, the relative expression level of defensin 1 gene of 6-day-old worker bee larvae in 11.08 to 16.08 mg/g lysine groups was significantly increased (P<0.05). In conclusion, lysine can promote the growth of *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae, promote the deposition of protein and lysine, increase the rate of eclosion, and regulate the lipid metabolism and the immunity of larvae to some extent. Based on the above indexes, it is

recommended that the appropriate lysine level in the diet of *Apis mellifera ligustica* worker bee larvae is 11.08 to 16.08 mg/g.

Key words: *Apis mellifera ligustica*; worker bee; larvae; lysine